



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0105724
(43) 공개일자 2024년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/4525 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)

A61P 17/08 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/4525 (2013.01)

A61P 17/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-0188017

(22) 출원일자 2022년12월28일

심사청구일자 2022년12월28일

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

임수중

경기도 성남시 분당구 판교원로82번길 60, 1405동 201호(운중동, 경남아너스빌아파트)

임민영

서울특별시 광진구 능동로31길 12-3, 203호(군자동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인리체

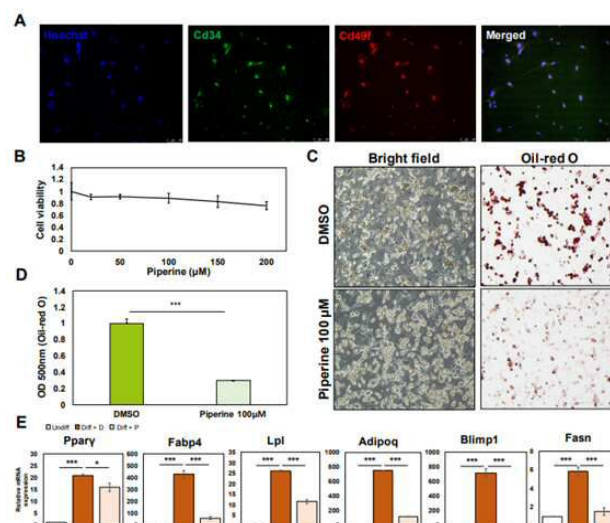
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 두피 또는 모발 피지 분비 감소용 조성물

(57) 요약

본 발명의 피페린을 포함하는 조성물은 피지샘의 유분 생성을 억제할 수 있으므로, 두피 또는 모발의 피지 분비를 감소시킬 수 있다. 본 발명은 분리된 모낭 줄기세포에 피페린을 처리하는 단계를 포함하여, 상기 모낭 줄기세포가 지방 세포로 분화하는 것을 억제시킬 수 있는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 17/08 (2018.01)

C12N 5/0628 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

(72) 발명자

박의현

서울특별시 영등포구 양산로3길 15, 301호(양평동 3가)

김낙형

서울특별시 송파구 삼학사로13길 28, 402호(삼전동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711169455

과제번호 2020R1A2C1007445

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 암 억제인자 p53과 암 항원 PRAME 사이의 상호 억제작용

기 여 율 7/10

과제수행기관명 세종대학교

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345348450

과제번호 2020R1I1A1A01053136

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축

연구과제명 비만 조절과정에서 ASXL family에 의한 후성유전학적 기전 규명

기 여 율 3/10

과제수행기관명 세종대학교

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

피페린(piperine)을 포함하는 두피 또는 모발 피지 분비 감소용 조성물.

청구항 2

피페린을 포함하는 인 비트로에서의 모낭 줄기세포(bulge stem cell)로부터 지방세포로의 분화 억제용 시약 조성물.

청구항 3

분리된 모낭 줄기세포(bulge stem cell)에 피페린을 처리하는 단계를 포함하는 모낭 줄기세포로부터 지방 세포로의 분화를 억제하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 두피 또는 모발 피지 감소용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 피페린은 후추, 장후추에서 발견되는 염기성의 식물성분으로 분자식은 $C_{17}H_{19}NO_3$ 이다. 피페린의 잘 알려진 생리활성 반응으로는 항염증반응, 해열작용, 항진균성 반응, 항산화효과, 지사효과, 항암효과등이 있다.

[0004] 피지를 분비하는 피지선은 얼굴 쪽에 높은 밀도로 존재하는데 모낭 협부와 연결되어 있으며 모낭과 함께 털피지샘 단위로 일컬어진다. 피지선의 가장 바깥층은 세포 한 층으로 되어있는 말초부(peripheral zone, PZ)로, 분화하지 않고 증식만을 하는 전피지 세포가 위치해 있으며 그 안쪽은 성숙부(maturation zone, MZ)로 지방소립을 함유한 피지 세포가 위치해 있다. 피지세포는 PZ에서 MZ를 거쳐 분화가 일어나며 최종적으로 가장 안쪽에 위치한 괴사부(necrotic zone, NZ)에서 분화된 피지세포의 핵과 막이 분해되면서 피지를 분비하게 된다. 피지는 트리글리세리드(triglyceride), 왁스 에스테르(wax esters), 스쿠알렌(squalene), 콜레스테롤 에스테르(cholesterol esters), 콜레스테롤(cholesterol)로 구성되어 있으며, 세균에 의해 트리글리세리드가 분해되어 생성된 유리지방산은 여드름의 염증성 병변 발생에 중요한 역할을 하게 된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제 2375935호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 피페린(piperine)을 포함하는 두피 또는 모발 피지 감소용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 본 발명은 피페린을 포함하는 인 비트로에서의 모낭 줄기세포(bulge stem cell)로부터 지방세포로의 분화 억제용 시약 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 본 발명은 분리된 모낭 줄기세포에 피페린을 처리하는 단계를 포함하는 모낭 줄기세포로부터 지방 세포로의 분화를 억제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 1. 피페린(piperine)을 포함하는 두피 또는 모발 피지 분비 감소용 조성물.
- [0012] 2. 피페린을 포함하는 인 비트로에서의 모낭 줄기세포(bulge stem cell)로부터 지방세포로의 분화 억제용 시약 조성물.
- [0013] 3. 분리된 모낭 줄기세포(bulge stem cell)에 피페린을 처리하는 단계를 포함하는 모낭 줄기세포로부터 지방 세포로의 분화를 억제하는 방법.

발명의 효과

- [0015] 본 발명의 조성물은 두피의 피지 분비 및 모발 유분을 감소시킬 수 있다.
- [0016] 본 발명의 조성물은 피지샘의 유분 생성을 억제할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 피페린을 포함하는 시약 조성물은 인 비트로에서의 모낭 줄기세포가 지방세포로 분화하는 것을 억제할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 피페린에 의한 모낭 줄기세포로부터 지방세포로의 분화가 억제된 것을 보여주는 사진 및 그래프이다.
- 도 2는 HFD(High Fat Diet)를 먹인 마우스의 체중과 모발 유분에 대한 피페린의 효과를 보여주는 사진 및 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 두피 또는 모발 피지 분비 감소용 조성물에 관한 것으로, 피페린을 포함함으로써, 모낭 줄기세포로부터 지방세포로의 분화를 억제하고, 두피 또는 모발의 피지 분비를 감소시킬 수 있다.
- [0021] 피페린(piperine)은 인삼, 후추, 겨자, 무, 고추냉이, 마늘 및 양파로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 천연물로부터 유래된 화합물일 수 있다. 상기 피페린은 통상의 기술분야에 공지된 일반적인 추출방법, 분리 및 정제방법을 이용하여 제조할 수 있다.
- [0022] 피지(sebum)는 피부에 있는 피지샘에서 나오는 분비물로, 두피 및 얼굴을 포함한 피부에서 피부의 보습유지나 미생물의 침입을 막지만, 사춘기 이후에는 여드름을 유발시킨다. 또한, 20대 이후의 여성의 경우 피지의 과잉 분비로 인해 피부 번들거림, 화장의 들뜸 및 모공이 넓어지는 등 미용면에서 많은 문제가 유발된다. 그리고 피지의 과다 분비는 여드름의 발생뿐만 아니라 여드름의 악화 및 지루성 피부염, 탈모 등에도 영향을 미친다.
- [0023] 피지샘은 인체의 거의 전 부분에 분포하고 있으며, 특히 머리, 이마, 얼굴의 중앙 부위, 등 및 가슴 분위에 많이 존재한다.
- [0024] 피지 분비 감소란 상기 피지의 과잉 분비가 억제되는 것을 말하고, 상기 피페린을 함유한 조성물이 피지샘의 분화를 억제하거나 모낭 줄기세포의 지방세포로의 분화를 억제함으로써 달성될 수 있다.
- [0025] 모발 피지 감소는 모발의 유분 감소를 포함한다. 상기 모발의 유분은 중성지방, 콜레스테롤, 세라마이드, 유리 지방산, 왁스 에스테르 및 스쿠알렌으로 구성될 수 있다.

- [0026] 본 발명의 조성물은 그 유효성분을 두피 또는 모발 피지 분비 감소 효과를 나타낼 수 있는 한 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함할 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 99.999 중량 % 범위 내에서 결정될 것이다. 상기 유효량이란 모낭줄기세포의 지방세포로의 분화 억제 활성을 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 조성물은 약학 조성물 또는 건강기능식품의 형태로 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 조성물은 지루성 두피염 또는 탈모 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.
- [0030] "예방"이란 조성물 및/또는 건강기능식품의 투여로 지루성 두피염 또는 탈모 발생을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0031] "치료" 또는 "개선"이란 본원 조성물 및/또는 건강기능식품의 투여로 상기 질환의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [0032] 본 발명의 조성물에는 약학적으로 허용 가능한 담체가 포함될 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 신체의 한 기관 또는 부분으로부터 신체의 다른 기관 또는 부분으로 활성 성분을 수송하는 역할을 하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제 또는 용매와 같은 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 운반체(vehicle)를 의미한다. 본 발명의 조성물은 방사무너돌김 추출물과 함께 추가로 약학적으로 허용되는 1종 이상의 담체를 첨가하여 약제로 제조할 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용 가능한'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말한다. 상기 담체로는 식염수, 완충 식염수, 물, 글리세롤 및 에탄올 등이 있으나 이에 한정되지 않으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.
- [0033] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여될 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 투여 대상에게 본 발명의 약제학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다.
- [0035] 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있다.
- [0036] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 젼제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다.
- [0037] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 젼제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오즈 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젼라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 조성물은 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 제제는 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치에 의해 결정될 수 있다. 특정 대상에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 대상의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 전술한 사항을 고려하여 결정할 수 있으며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 조성물은 지루성 두피염 또는 탈모의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용하거나, 수술, 호르몬

치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

- [0040] 본 발명의 조성물이 적용될 수 있는 대상은 이러한 질환이 발생할 수 있는 임의의 동물일 수 있으며, 상기 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.
- [0042] 본 발명의 조성물은 두피 또는 모발 피지 분비 감소용 건강기능식품을 제공한다.
- [0043] 상기 건강기능식품은 지루성 두피염 또는 탈모의 예방 또는 개선에 도움이 된다.
- [0044] 본 발명의 건강기능식품은 상기 피페린을 포함한 음료 (알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품 (예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품 (예: 햄, 소시지콘비이프 등), 빵류 및 면류 (예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품 (예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등일 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명의 건강기능식품은 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제, 액제 제형 등으로 제형화된 것일 수도 있다. 이들은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 제형화될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 건강기능식품에 더 포함될 수 있는 첨가제로는, 천연 탄수화물, 향미제, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제(합성 풍미제, 천연 풍미제 등), 착색제, 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH조절제, 안정화제, 방부제, 산화 방지제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 및 과육으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 사용할 수 있다.
- [0047] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0048] 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘, 미네랄 오일 및 이들의 혼합물 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 상술한 제형 내 유효성분으로서의 본 발명의 건강기능식품의 함량은 사용 형태 및 목적, 사용자 상태, 증상의 종류 및 경증 등에 의하여 적절하게 조절할 수 있으며, 고형분 중량 기준으로 0.001 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 본 발명은 피페린을 포함하는 인 비트로에서의 모낭 줄기세포(bulge stem cell)로부터 지방세포로의 분화 억제용 시약 조성물을 제공한다.
- [0052] 피페린은 상기 설명한 바와 같다.
- [0053] 인 비트로(*in vitro*)는 시험관 내를 말한다.
- [0054] 모낭 줄기세포(bulge stem cell)는 hair follicle stem cell이라고도 말한다. 모낭 줄기세포는 모낭과 모낭 사이의 표피(interfollicular epidermis)라고 불리는 표피의 기저층(the basal cell layer of epidermis)에 위치하고 있는 약 10%의 줄기세포 및 모낭(hair follicle)에 존재하는 줄기세포를 포함하며, 상기 모낭 줄기세포는 인간을 포함하는 모든 포유류의 두피조직에서 유래될 수 있다. 상기 두피조직은 모낭을 포함한다.
- [0055] 모낭 줄기세포는 당업계에서 공지된 통상의 방법을 통해 수득할 수 있다. 예를 들어, 모낭 주변의 지방 및 콜라겐과 모유두 부분을 제거하여 벌지(bulge) 지역을 분리하고, 상기 벌지를 플레이트에 배양한 뒤, 마커 염색을 통해 모낭 줄기세포를 검정하여 수득할 수 있다.
- [0056] 모낭 줄기세포를 검정할 수 있는 마커는 Cd34, Cd49f, rat Alexa-488, rabbit Alexa-568 또는 Hoechst 33342

를 포함할 수 있다.

[0057] 지방세포는 생명체의 피지 및 유분을 구성하는 모든 지방세포를 포함한다.

[0058] 분화(differentiation)란 덜 특화된 세포가 특정한 세포로 발달하여 세포의 크기나 모양, 막전위, 대사활성, 신호에 대한 반응이 특정한 유형의 세포로 변화하는 현상을 말한다. 예를 들어, 상기 모낭 줄기세포는 지방세포로 분화하는 것일 수 있다.

[0059] 본 발명의 시약 조성물은 피페린을 포함함으로써, 모낭줄기세포의 지방세포로의 분화를 억제할 수 있다.

[0060] 본 발명의 시약 조성물은 모낭 줄기세포를 포함하는 배지에 처리될 수 있다. 배지는 당업계에 알려진 기본 배지일 수 있다. 상업적으로 판매되는 배지도 사용할 수 있다. 통상적으로 MEM(Minimal Essential Medium), DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI(Roswell Park Memorial Institute Medium), K-SFM(Keratinocyte Serum Free Medium) 등과 같은 배지들이 일반적인 세포 배양에 사용되는 기본 배지일 수 있으며, 이 외에 M199/F12(mixture)(GIBCO, USA), MEM-alphah 배지(GIBCO, USA) 등 당업계에 사용되고 있는 배지일 수 있다.

[0061] 배지는 모낭줄기세포의 배양을 용이하게 하기 위해 ITS+premix(insulin, transferrin, selenious acid를 함유하는 광범위 배양 보충물)나 EGF(epidermal growth factor), bFGF(basic fibroblast growth factor), Dexamethasone, IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine), 인슐린, 항생제 등을 더 포함하는 것일 수 있다.

[0062] 본 발명의 시약 조성물은 예를 들어 피페린 농도가 120 μ M, 110 μ M, 100 μ M, 90 μ M, 80 μ M, 바람직하게는 110 μ M, 100 μ M, 90 μ M가 되도록 처리될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 본 발명은 분리된 모낭 줄기세포(bulge stem cell)에 피페린을 처리하는 단계를 포함하는 모낭 줄기세포로부터 지방 세포로의 분화를 억제하는 방법을 제공한다.

[0065] 상기 모낭 줄기세포, 지방세포 및 분화는 상기 설명한 바와 같다.

[0066] 상기 모낭 줄기세포는 당업계에서 공지된 통상의 방법을 통해 분리할 수 있다.

[0067] 상기 분리된 모낭 줄기세포에 피페린을 처리하는 단계는 상기 분리된 모낭 줄기세포의 배양배지에 피페린을 첨가하는 것을 포함할 수 있다.

[0068] 상기 배양배지는 상기 설명한 바와 같다.

[0070] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0072] 실시예

[0073] 1. 실험방법 및 재료

[0074] 1) 시약 및 화학물질

[0075] Oil Red O (ORO), dexamethasone (Dex), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 인슐린, dimethylsulfoxide (DMSO), 피페린은 Sigma (St. Louis, MO, USA)제품을 구매하여 사용하였다. Fetal bovine serum (FBS)은 GIBCO (Grand Island, NY, USA)제품을 구매하여 사용하였다. 오염 방지를 위해 antibiotics/antimycotics는 Invitrogen(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)사의 제품을 구매하였다.

[0077] 2) 실험동물

[0078] 실험동물은 3주령 수컷 마우스(C57BL/6, 코아텍)를 분양받아 사육실의 온도 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $45 \pm 5\%$, 조명주기 12시간씩 명암을 유지하였다. 실험동물은 3일에 한 번씩 몸무게 증가량을 측정하였고 실험군은 normal diet(ND), normal diet + 피페린 (ND + piperine), high fat diet(HFD), high fat diet + 피페린 (HFD + piperine)로 총 4개군으로 나누어 식이를 공급하였다. 두월 바이오텍에서 사료를 구매하였고, piperine은 0.05% 첨가되었다. 마우스를 이용한 실험을 진행하기 위해 경추탈골 방법을 사용하였고 H&E, ORO staining은 마우스

의 back skin을 이용하여 진행하였으며 표피, 진피, 피하지방 층이 모두 있는 상태에서 실험을 진행하였다.

[0080] 3) 모낭 줄기세포(Bulge stem cell)의 분리

[0081] C57BL/6, 수컷 마우스 콧수염 모낭을 포셉을 이용하여 모낭 주변의 지방 및 콜라겐과 모유두 부분을 제거하여 모낭 돌출부(bulge) 지역을 분리하였다. 계대 배양할 미디어를 배양용 6 well plate에 2ml씩 분주하고 분리된 모낭 돌출부를 well에 넣어주었다. 5% CO₂ 37℃ 환경에서 배양 후 분리된 모낭 돌출부가 plate에 부착하여 증식 되는 세포가 있는 것을 확인하였다. 계대 배양 후 Cd34 및 Cd49f 마커 염색을 통해 모낭 줄기세포를 검정하는 방법을 통하여 모낭 줄기세포의 확립을 확인하였고, 이와 같은 면역세포화학(immunocytochemistry)을 통한 마커 확인 방법은 4)에 명시하였다.

[0083] 4) 면역세포화학(Immunocytochemistry, ICC)

[0084] 모낭 줄기세포의 identity를 확인하기 위해 진행하였다. Media 제거 후 PBS로 세척, 4% paraformaldehyde (PFA)로 고정을 해주었고 다시 PBS로 세척 해주었다. 0.5% PBST로 permeabilization을 진행하였고 blocking을 30분 진행하였다. 이 후 1차 항체 (Cd34, Cd49f 각각 1:200) over night 처리해주었으며, 워싱 후 2차 항체 (각각 rat Alexa-488, rabbit Alexa-568 1:500) 2시간 진행, Hoechst 33342를 5분 처리 해주었다.

[0086] 5) 세포배양 및 지방분화

[0087] 모발의 주기와 피지샘으로 이동하여 지방분화를 조절한다고 알려져 있는 모낭 줄기세포는 마우스의 콧수염에서 분리하였고, 10% FBS, 1% antibiotics/antimycotics, B27 (with VitA)가 함유된 DMEM, DMEM/F12 혼합 미디어에서 배양하였다. 지방세포 분화를 위해 모낭 줄기세포는 6 well plate에 세포를 분주한 후 세포밀도가 100%가 되기를 기다린 후, 분화를 유도하였다. 분화시작을 위해서는 0일째에 10% FBS에 0.5 μM dexamethasone, 100 μM IBMX, 그리고 1 μg/ml 인슐린을 첨가 한 후 대조군으로 DMSO, 실험군에는 피페린 100 μM을 처리하여 10일간 배양하였다. 배지는 2일마다 위와 같은 조건으로 교환해 주었다.

[0089] 6) MTT assay

[0090] 모낭 줄기세포에서 피페린의 세포 독성을 확인하기 위하여 진행하였다. 세포 독성에 의한 세포의 사멸이 발생하지 않는 100uM 농도에서 지방 분화 실험을 진행하였다.

[0092] 7) Oil Red O 염색

[0093] 분화가 완료된 모낭 줄기세포는 PBS (pH 7.6) 2 ml 로 세척하였고, 10% 포르말린 (formalin)이 함유된 PBS에서 5분간 상온에서 고정하였다. 고정이 끝난 후 멸균된 증류수를 사용해 2회 세척하였고 0.5% Oil Red O 가 함유된 60 % 이소프로판올 2 ml를 이용하여 10분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 멸균 증류수 2 ml를 사용하여 3회 세척 하였고 현미경을 이용하여 사진을 촬영한 후, 100% 이소프로판올 2 ml를 사용하여 세포에 축적된 지질성분을 추출하여 500nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 조직의 경우 4% PFA에서 고정 후 증류수를 이용해 세척 하였고 0.5% Oil Red O 가 함유된 60 % 이소프로판올 2 ml를 이용하여 10분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 멸균 증류수 2 ml를 사용하여 3회 세척 하였고 현미경을 이용하여 사진을 촬영하였다.

[0095] 8) 전체 RNA 분리 및 real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

[0096] 분화가 끝난 모낭 줄기세포로부터 전체 RNA의 추출은 Invitrogen 사의 TRIzol 용액을 사용하여 수행하였다. 분리된 전체 RNA로부터 cDNA 합성은 Invitrogen사의 MMLV reverse transcriptase와 random primers를 사용하여 회사가 제공하는 실험방법을 토대로 수행하였다. 표적 유전자의 발현을 확인하기 위한 PCR 반응은 HighQu사의 iQ SYBR green Supermix와 Icyler GFX96 real-time PCR detection system을 활용하여 수행하고 분석하였다. 사용한 프라이머 세트 (정방향+역방향)는 하기 표 1에서 볼 수 있다. 모든 유전자의 mRNA 발현수준은 GAPDH

mRNA 발현량으로 보정하여 분석하였다.

표 1

Gene	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
Pparg	TTTCAAGGGTGCCAGTTCAATCC(서열번호 1)	AATCCTTGGCCCTCTGAGAT (서열번호 2)
Fabp4	AAAGACAGCTCCTCCTCGAAGGTT(서열번호 3)	TGACCAATCCCCATTACGC (서열번호 4)
Lpl	ATCCATGGATGGACGGTAACG(서열번호 5)	CTGGATCCCAATACTTCGACCA (서열번호 6)
Adipoq	TGACGACACCAAAAGGGCTC(서열번호 7)	CACAAGTCCCTTGGGTGGA (서열번호 8)
Blimp1	TTCCAACATTTACCCCTTCACTT(서열번호 9)	GAGGTGCCCGGATAGGATAAA (서열번호 10)
Fasn	CACAGTGCTCAAAGGACATGCC(서열번호 11)	CACCAGGTGTAGTGCCTTCCTC (서열번호 12)

2. 실험 결과

1) 피페린은 모낭 줄기세포의 지방분화를 억제한다.

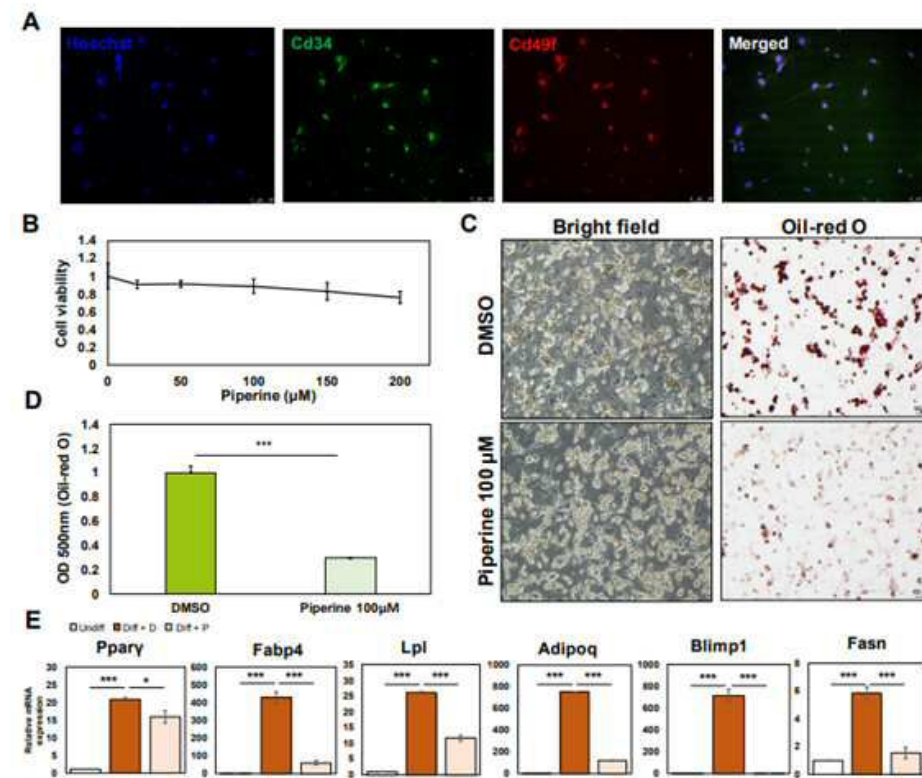
피페린이 모낭 줄기세포로부터 지방세포로의 분화에 미치는 영향을 분석하기 위해 bulge stem cell 세포주의 지방세포분화를 수행하였고, Oil Red O 염색을 수행하여 측정하였다. 분화 실험에 앞서 모낭 줄기세포의 identity를 확인하기 위해 모낭 줄기세포의 마커를 확인하였고(도 1A), 피페린의 세포 독성을 측정하였다(도 1B). 분화 실험결과 지방세포분화 중 피페린이 처리되면 모낭 줄기세포의 지방세포분화가 억제되었다(도 1C). 지방세포분화를 통해 축적된 지질의 양을 측정한 결과 100 μ M 농도의 피페린이 처리된 경우 대조군 대비 20.6% 수준까지 지질축적이 억제되었다(도 1D). Fabp4와 Adipoq, Lpl은 지방세포 분화 중 지질축적에 중요한 기능을 하는 유전자이므로 이 유전자들의 mRNA 발현 수준을 측정하였다. 또 한 피지샘의 분화 마커인 Blimp1와 Fasn의 mRNA 발현 수준을 측정하였다. 모낭 줄기세포의 지방세포 분화 중 처리된 피페린은 Fabp4와 Adipoq, Lpl, Blimp1, Fasn의 mRNA의 발현을 억제하였다(도 1E).

2) 피페린은 피지샘 분화를 억제한다.

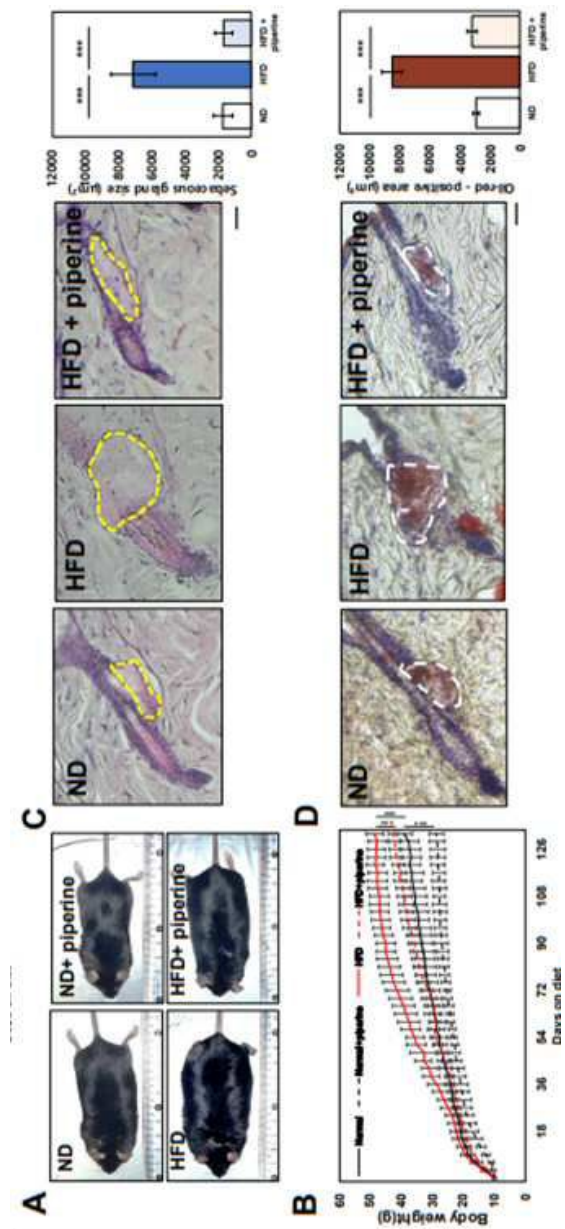
피페린은 섭취 가능한 천연물이기 때문에 피페린 섭취 시 *in vivo* 환경에서 *in vitro* 환경과 동일한 결과가 도출될 수 있는지 확인하고자 mouse 실험을 진행하였다. 실험군은 Normal diet (ND), Normal diet + 피페린 (ND + piperine), High fat diet (HFD), High fat diet + 피페린 (HFD + piperine) 총 4군이었고, 18주 동안 diet를 진행하였다. 각 마우스 간의 먹이 섭취량에는 큰 차이가 없었고 HFD에서 털의 유분기가 증가하였으나 HFD + 피페린에서 털의 유분기가 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 2A). 또한 무게의 감소도 확인할 수 있었다(도 2B). 각각의 피부 샘플을 통하여 skin의 차이를 비교해보았을 때, HFD의 피지샘 크기가 커진 것을 확인할 수 있었고, 피페린 섭취 시 피지샘이 감소한 것을 관찰하였다(도 2C). 더불어 ORO staining을 통해 lipid 축적의 정도 차이를 비교하였을 때, HFD 대비 HFD + 피페린에서 lipid 축적이 감소된 것을 확인하였다(도 2D).

도면

도면1



도면2



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.